Simplexa™ CMV Quantitation Standards

REF MOL2210
Rev. B

Die Simplexa™ CMV-Quantifizierungsstandards sind zur Erstellung einer Standardkurve für den Simplexa™ CMV-Assay auf dem 3M Integrated Cycler bestimmt.

***In-vitro*-Diagnostikum**

ANWENDUNGSBEREICH

Die Simplexa™ CMV-Quantifizierungsstandards sind zur Erstellung einer Standardkurve für den Simplexa™ CMV-Assay auf dem 3M Integrated Cycler bestimmt.

HINTERGRUND

Der Assay mit den Simplexa™ CMV-Quantifizierungsstandards entspricht dem CMV-Standard der WHO[1]. Die Angabe der Viruslast im Simplexa™ CMV-Assay in Kopien/ml entspricht dem CMV-Standard der WHO von IE/ml.

MITGELIEFERTES MATERIAL

Der Simplexa™ CMV-Quantifizierungsstandard-Satz von Focus Diagnostics enthält ausreichend Reagenzien für zwei Bestimmungen.

Beschreibung des Quantifizierungsstandard-Kits (QS)

Focus Diagnostics' Simplexa™ CMV-Quantifizierungsstandards (REF MOL2210)					
Kit-Komponente	**REF**	**Anzahl der Röhrchen pro Kit**	**Reaktionen pro Röhrchen**	**Volumen (µl) pro Gefäß**	**Beschreibung der Komponente**
Simplexa™ CMV Quantitation Standard 1 (QS-1) (Quantifizierungsstandard 1)	**MOL2211**	1	2	400	CMV-Amplicon in humaner Basismatrix
Simplexa™ CMV Quantitation Standard 2 (QS-2) (Quantifizierungsstandard 2)	**MOL2212**	1	2	400	CMV-Amplicon in humaner Basismatrix
Simplexa™ CMV Quantitation Standard 3 (QS-3) (Quantifizierungsstandard 3)	**MOL2213**	1	2	400	CMV-Amplicon in humaner Basismatrix
Simplexa™ CMV Quantitation Standard 4 (QS-4) (Quantifizierungsstandard 4)	**MOL2214**	1	2	400	CMV-Amplicon in humaner Basismatrix
Simplexa™ CMV Quantitation Standard 5 (QS-5) (Quantifizierungsstandard 5)	**MOL2215**	1	2	400	CMV-Amplicon in humaner Basismatrix

ERFORDERLICHES, JEDOCH NICHT MITGELIEFERTES MATERIAL

1. Simplexa™ CMV (REF MOL2200)
2. 3M Integrated Cycler mit 3M Integrated Cycler Studio-Software, Version 4,1 oder höher
3. Universal Discs zur Verwendung auf dem Integrated Cycler von 3M
4. Universal Disc-Abdeckfolie
5. [a] Roche MagNA™ Pure LC System und zugehöriges Verbrauchsmaterial
6. [a] Roche MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit (Roche Kat.- Nr. 3038505001)
7. [b] NucliSENS® easyMAG™ Gerät von bioMérieux und dazugehörige(s) Verbrauchsmaterial und Reagenzien
8. [b] Biohit/bioMérieux Mehrkanalpipette
9. [b] ELISA-Streifenplatte
10. Ein-, Mehrkanalmikropipette(n) und/oder Repetiermikropipette(n) mit einem Genauigkeitsbereich von 1-10 µl, 10-100 µl und 100-1000 µl
11. Gefrierschrank, -10 °C bis -30 °C (mit manueller Abtaufunktion), für die Lagerung der gefrorenen Kit-Komponenten
12. Kühlschrank mit 2 °C bis 8 °C (für aufgetaute Kit-Komponenten und Standards)

13. Biologische Sicherheitswerkbank (Laminarflow-Haube) für die Durchführung der Extraktionen
14. Mikrozentrifuge
15. Vortex-Mischer
16. Sterile, RNase/DNase-freie Einmalpipettenspitzen mit Aerosolbarriere
17. 1,5 ml Polypropylen-Mikrozentrifugenröhrchen und Ständer (RNase-/DNase-freie Röhrchen werden empfohlen, sind aber nicht vorgeschrieben)
18. Einweg-Schutzhandschuhe (ungepudert)
19. Nukleasefreies Wasser (zur Extraktion und als Leerwert-Kontrolle (No-Template Control NTC))
20. Kühlständer für 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen

[a] Zur Verwendung beim Roche MagNA Pure LC-Extraktionsverfahren
[b] Zur Verwendung beim bioMerieux easyMAG Extraktionsverfahren.

HALTBARKEIT UND HANDHABUNG

1. Die Standards bei -10 °C bis -30 °C lagern (keine Gefriergeräte mit Abtauautomatik verwenden).
2. Die aufgetauten Standards nach erstmaligem Gebrauch maximal 5 Tage bei 2 °C bis 8 °C lagern.
3. Die Standards dürfen nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

1. *In-vitro*-Diagnostikum
2. Alle Humanprodukte sollten als potentiell infektiös angesehen werden. Das Ursprungsmaterial dieses Produktes ist mit US-FDA-anerkannten Methoden auf HBs-Antigen, Hepatitis C-Antikörper und HIV-1/2 (AIDS) Antikörper untersucht und für negativ befunden worden. Dennoch gewährleistet keine der bekannten Testmethoden absolute Garantie dafür, dass Produkte, die aus menschlichem Blut gewonnen wurden, die genannten oder andere infektiöse Krankheiten nicht übertragen können. Alle Kontrollen, Serumproben und Geräte, die in Kontakt mit den Proben kommen, sollten daher als potentiell infektiös angesehen und durch entsprechende biologische Sicherheitsmaßnahmen dekontaminiert oder entsorgt werden. Die amerikanischen CDC und National Institutes of Health empfehlen, dass potentiell infektiöse Materialien mit biologischer Sicherheitsstufe 2 gehandhabt werden.[2,3]
3. Beim Umgang mit den Kit-Reagenzien persönliche Schutzausrüstung wie (jedoch nicht beschränkt auf) Handschuhe und Laborkittel tragen. Hände nach der Durchführung des Tests gründlich waschen.
4. Nicht mit dem Mund pipettieren.
5. In Bereichen, in denen Kit-Reagenzien und/oder Humanproben gehandhabt werden, darf nicht geraucht, getrunken und gegessen werden. In diesen Bereichen sollten auch keine Kontaktlinsen eingesetzt/herausgenommen und kein Make-up aufgetragen werden.
6. Nicht verwendete Standards in Übereinstimmung mit den nationalen und regionalen Vorschriften entsorgen.
7. Die Kontamination von Reagenzien bzw. Patientenproben kann zu einer Verfälschung der Testergebnisse führen. Unter aseptischen Bedingungen arbeiten.
8. Die Standards vorsichtig pipettieren und handhaben, um eine Kontamination mit Material aus benachbarten Kavitäten zu verhindern.
9. Geeignete Pipettiertechniken anwenden und für die Dauer des Tests das gleiche Pipettierschema einhalten, um optimale und reproduzierbare Werte zu erhalten.
10. Die Standards nicht gegen Standards anderer Kit-Chargen oder anderer Hersteller austauschen bzw. mit diesen mischen.
11. Die Verschlusskappen der Reagenzröhrchen nicht vertauschen. Dies könnte zur Kontamination führen und die Testergebnisse beeinträchtigen.
12. Universal Discs, die bereits in Kontakt mit Patientenproben oder Reagenzien gekommen sind, nicht wieder verwenden.
13. Gebrauchte Discs ohne Abnehmen oder Entfernen der Abdeckfolie entsorgen.
14. Das Kit bei offensichtlich angebrochener oder beschädigter Verpackung nicht verwenden und Focus Diagnostics kontaktieren. Kontaktadressen befinden sich auf der letzten Seite dieses Dokuments.

GEBRAUCHSANWEISUNG

A BEREICH ZUR EXTRAKTION DER QUANTIFIZIERUNGSSTANDARDS

Durchführung in einem Bereich, der speziell für die Extraktion bestimmt ist. Die Vorbereitung der Quantifizierungsstandards für die Extraktion wird auf einer biologischen Sicherheitswerkbank durchgeführt.

Extraktion mit dem MagNA Pure LC-Extraktionsverfahren von Roche

1. Die Extraktion der Quantifizierungsstandards erfolgt mit dem Roche MagNA Pure Total Nucleic Acid Isolation-Kit und dem Roche MagNA Pure LC Automated Nucleic Acid Extractor-Gerät. Hinsichtlich der Nukleinsäureextraktion mit diesem Kit die Gebrauchsanweisungen des Herstellers beachten.
2. Im Dropdownmenü „Protocol“ des MagNA Pure LC-Systems die Optionen „Total NA“ (Gesamtzahl der Nukleinsäuren) und anschließend „Total NA Variable_elution_volume.blk“ wählen. Damit werden die passenden Einstellungen für den Lauf geladen.
3. Das Probenprotokoll sollte „Total NA Variable_elution_volume“ sein.
4. Als Probenvolumen sollte 200 µl und als Elutionsvolumen 50 µl eingestellt sein.
5. Das Verdünnungsvolumen sollte für alle Proben auf Null eingestellt sein.
6. Das „Post Elution Protocol“ muss auf „None“ (Keine) eingestellt sein.

7. Darauf achten, dass die Quantifizierungsstandards und die Leerwertkontrolle sich in der Probenkartusche an der richtigen Position befinden.
8. Jeden Standard und jede Leerwert-Kontrolle 2-4 Sekunden vortexen und kurz zentrifugieren, um die Inhaltsstoffe auf den Boden des Röhrchens zu ziehen.
9. 200 µl von jedem Standard und der Leerwert-Kontrolle in die entsprechende Position in der Probenkartusche pipettieren.
10. Den Füllpegel der Standards und Leerwert-Kontrolle in der Probenkartusche einer Sichtprüfung unterziehen, um sicherzustellen dass Standard(s) zugegeben wurde(n).
11. Die DNA zur Extraktions- und Amplifikationskontrolle zweimal pulsvortexen und kurz zentrifugieren, um die Inhaltsstoffe auf den Boden des Röhrchens zu ziehen.
12. Für jeden Satz Standards 100 µl der internen Kontrolle in 6 ml Lysepuffer in ein konisches Röhrchen pipettieren. Kurz auf dem Vortex mischen. In das entsprechende Fach des MagNA Pure Extraktionsgerätes geben.
13. Die Probenkartusche in das MagNA Pure LC Automated Nucleic Acid-Extraktionsgerät überführen und die Extraktion starten.
14. Nach Abschluss der Nukleinsäureextraktion kann die Kartusche mit den extrahierten Standards aus dem MagNA Pure herausgenommen und verschlossen werden. Die extrahierte DNA vor der Verwendung bei 2 °C bis 8 °C aufbewahren. Die Langzeitlagerung extrahierter Standards bei dieser Temperatur wird nicht empfohlen. Extrahierte DNA-Proben beim Laden der Disc auf einem Kühlblock aufbewahren.

Extraktion mit dem NucliSENS® easyMAG™-Extraktionsverfahren von bioMérieux

1. Zur Bedienung von Gerät und Software ist das Benutzerhandbuch des NucliSENS® easyMAG™ zu beachten.
2. In der NucliSENS® easyMAG™ Software die Vorlage „Generic“ (Allgemein) mit folgenden Einstellungen wählen:

Default Request (Standardanfrage):	Generic 2.0.1 (or equivalent) (oder äquivalent)
Run Name Prefix (Anfangskode der Laufbezeichnung:	(as appropriate) (beliebig)
Sample ID prefix (Anfangskode der Proben-ID):	(as appropriate) (beliebig)
Sample Type (Probentyp):	Primary (Primär)
Workflow Defaults (Standardarbeitsabläufe):	On-board lysis Incubation (Lyse-Inkubation im Gerät) On-board Silica Incubation (Inkubation mit Silica im Gerät) Sample Addition Guidance Off (Hinweise zur Zugabe von Proben Aus)
Reagent Tracking (Rückverfolgung der Reagenzien):	Lysis, Silica, Internal Control reagent tracking disabled (Rückverfolgung von Lyse-Reagenz, Silica und interner Kontrolle deaktiviert)

3. Die individuellen Probendaten in der Bildschirmmaske „Extraction Request“ (Extraktionsanforderung) wie folgt eingeben:

Sample ID (Proben-ID):	(Enter sample name)(Probenbezeichnung eingeben)
Request (Anfrage):	Generic 2.0.1 (or equivalent) (oder äquivalent)
Volume (Volumen) (mL):	0,200
Eluate (Eluat) (µL):	50
Type (Typ):	Primary (Primär)
Priority (Priorität):	Normal
Matrix:	Other (Sonstige)

4. Nach den Angaben im Benutzerhandbuch in der NucliSENS® easyMAG™ Software einen „Extraction Run“ (Extraktionslauf) erstellen.
5. Jeden Standard 2-4 Sekunden vortexen und kurz zentrifugieren, um die Inhaltsstoffe auf den Boden des Röhrchens zu ziehen.
6. 200 µl des Standards und der Leerwert-Kontrolle in Probengefäße pipettieren.
7. Die interne Kontrolle zweimal (2x) pulsvortexen und kurz zentrifugieren, um die Inhaltsstoffe auf den Boden des Röhrchens zu ziehen.
8. In jede Standard- und Kontroll-Kavität 5 µl interne Kontrolle pipettieren. Zwischen den Standards die Pipettenspitze wechseln.
9. Nach den Angaben im Benutzerhandbuch das/die Probengefäß(e), neue Verbrauchsmaterialien für den Aspirator und die Reagenzien in das easyMAG™ Gerät laden.
10. Die Lyse im Gerät starten und die lysierten Proben 10 Minuten inkubieren, bevor das magnetische Silica-Gemisch zugegeben wird.
11. Das magnetische Silica-Gemisch während der Lyse-Inkubation vorbereiten. Silica mischen und mit nukleasefreiem Wasser verdünnen, indem 1 Teil magnetisches Silica zu 3 Teilen nukleasefreiem Wasser gegeben wird (z. B. 270 µl magnetisches Silica + 810 µl nukleasefreies Wasser). Je Probe mindestens 135 µl magnetisches Silica-Gemisch vorbereiten.
12. Zum Übertragen des Silica-Gemisches in die Kavitäten der ELISA-Streifen das magnetische Silica-Gemisch anmischen und 1 Spitze sowie den Betriebsmodus P2 der Biohit-Pipette verwenden. Auf **Start** drücken, um 1050 µl des magnetischen Silica-Gemisches anzusaugen, und nochmals auf **Start** drücken, um das erste Volumen zurück in das

Röhrchen mit Silica-Gemisch auszuwerfen. Auf **Start** drücken, um 125 µl des magnetischen Silica-Gemisches in 8 einzelne Kavitäten des ELISA-Streifens zu pipettieren. Bedarfsweise für weitere ELISA-Streifen wiederholen.

13. Nach der 10-minütigen Lyseinkubation 8 Spitzen (je ELISA-Teststreifen) und den Betriebsmodus P3 der Biohit-Pipette verwenden, um jedem Standard in dem Probengefäß 100 µl des magnetischen Silica-Gemisches zuzusetzen. Die Spitzen in die Kavitäten der ELISA-Streifen geben und **Start** drücken, um das magnetische Silica-Gemisch zu mischen und anzusaugen.
14. Das magnetische Silica-Gemisch in das jeweilige Probengefäß geben und die Pipettenspitze(n) in die Proben eintauchen. Sie sollten sich unterhalb des Flüssigkeitsspiegels befinden. Auf **Start** drücken, um das magnetische Silica anzusaugen, zu pipettieren und mit den Proben zu mischen (3x). Die Pipettenspitzen müssen unterhalb des Flüssigkeitsspiegels bleiben, damit der Mischvorgang korrekt ausgeführt wird.
15. Für jedes weitere Probengefäß Schritt 13 und 14 wiederholen.
16. Nach Zugabe des magnetischen Silica-Gemisches zu allen Probengefäßen den Extraktionslauf starten.
17. Nach Abschluss des Laufs das(die) Probengefäß(e) aus dem Gerät nehmen. Werden die extrahierten Standards und die Leerwert-Kontrolle nicht sofort weiterverwendet, sind sie in individuelle Röhrchen zu überführen, um das Risiko, dass magnetisches Silica zurück in die Probe fällt, zu minimieren. Die extrahierte DNA bis zum Gebrauch bei 2 °C bis 8 °C aufbewahren. Die Langzeitaufbewahrung extrahierter Proben bei dieser Temperatur wird nicht empfohlen. Extrahierte DNA-Proben beim Beschicken der Disc auf einem Kühlblock aufbewahren.

B. EINSTELLUNG DES GERÄTS FÜR DIE REAL-TIME-PCR

1. Einzelheiten darüber, wie die Integrated Cycler Studio Software zu konfigurieren ist, um eine Assaydefinition hinzuzufügen, eine Standardkurve zu erstellen (Kalibrierungslauf) und die Läufe auf dem Integrated Cycler zu analysieren, sind der Bedienungsanleitung des Integrated Cycler zu entnehmen.

- Hinweis: Der Kalibrierungslauf darf nur mit den Quantifizierungsstandards und der Leerwert-Kontrolle beschickt werden. Patientenproben und Positivkontrollen können abgearbeitet werden, sobald ein valider Kalibrierungslauf vorliegt.

Beispiel für ein Disc-Layout

	Speiche 1	Speiche 2	Speiche 3	Speiche 4	Speiche 5	Speiche 6	Speiche 7	Speiche 8	Speiche 9	Speiche 10	Speiche 11	Speiche 12
A	QS-1	QS-3	QS-5									
B	QS-1	QS-3	QS-5									
C	QS-1	QS-3	QS-5									
D	QS-1	QS-3	QS-5									
E	QS-2	QS-4	NTC									
F	QS-2	QS-4										
G	QS-2	QS-4										
H	QS-2	QS-4										

C. REAGENZIENZUBEREITUNGSBEREICH

Ein für die Vorbereitung des Reaktionsgemisches für den Simplexa™ CMV-Assay reservierter Bereich.

1. Primer-Mix und Master-Mix bei Raumtemperatur (etwa 18°C bis 25 °C) auftauen. Jedes Röhrchen im Kit enthält eine für 50 Reaktionen ausreichende Reagenzienmenge. Vor jedem Gebrauch Primer Mix- und Master Mix-Komponenten vorsichtig durchmischen und kurz zentrifugieren, um die Inhaltsstoffe auf den Boden des Röhrchens zu ziehen.
2. In ein Polypropylen-Mikrozentrifugenröhrchen entsprechender Größe jede Komponente in dem in der folgenden Tabelle angegebenen Volumen pipettieren, um das erforderliche Volumen des Reaktionsgemisches zuzubereiten.

Reaktionsgemischvolumen

Reagens	Reaktionsgemisch-Volumen / 1 Reaktion	Reaktionsgemisch-Volumen / 24 Reaktionen
Simplexa™ Master Mix	4,0 µl	96 µl
Simplexa™ CMV Primer Mix	1,0 µl	24 µl
Gesamtvolumen	5,0 µl	120 µl

3. Das Reaktionsgemisch durch Umdrehen des Röhrchens oder durch 8- bis 10-maliges Pipettieren vorsichtig mischen.
4. Kurz zentrifugieren, um die Inhaltsstoffe auf den Boden des Röhrchens zu ziehen.
5. Mit der Vorbereitung der PCR fortfahren.
6. Das Reaktionsgemisch innerhalb einer Stunde nach Zubereitung verwenden. Sofern die PCR-Vorbereitung nicht sofort nach dem Ansetzen des Reaktionsgemisches erfolgt, sollte dieses bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.

D. BEREICH FÜR DIE REAL-TIME-PCR-AMPLIFIKATION

In einem speziellen, der Vorbereitung der Universal Disc mit 96 Kavitäten für den Simplexa™ CMV-Assay vorbehaltenen Bereich arbeiten.

Bei der Durchführung folgender Vorbereitungsschritte das beispielhafte Disc-Layout in Abschnitt B beachten:

1. In jede Kavität 5,0 µl des Reaktionsgemischs pipettieren.
2. 5,0 µl des extrahierten Quantifizierungsstandards in die entsprechende Kavität „QS“ pipettieren.

3. 5,0 µl der extrahierten Leerwert-Kontrolle in die Kavität “NTC” pipettieren.
4. Die Disc mit dem Universal Disc Cover Tape abdecken.
5. Den Deckel des Integrated Cycler öffnen.
6. Die verschlossene Universal Disc auf die Platte legen.
7. Den Deckel vorsichtig schließen.
8. Auf **Run** (Lauf) klicken.
9. Auf **Start** klicken.

E. AUSWERTUNG DER STANDARDKURVE (KALIBRIERUNGSLAUF)

1. Die Integrated Cycler Studio-Software erkennt automatisch, ob ein Kalibrierungslauf gültig ist.
   a. Gültige Kalibrierungsläufe werden automatisch zur weiteren Nutzung gespeichert.
   b. Ungültige Kalibrierungsläufe werden verworfen und es muss anschließend ein neuer Kalibrierungslauf erfolgen, bevor Patientenproben getestet werden können.

EINSCHRÄNKUNGEN

1. Nur für das Simplexa™ CMV-Kit.
2. Die Personen, die die Analyse durchführen, sollten sich vor Durchführung des Assays eingehend mit den Testverfahren und der Ergebnisinterpretation vertraut gemacht haben.
3. Zur Quantifizierung unbekannter Patientenproben speichert die Integrated Cycler Studio-Software den letzten gültigen Kalibrierungslauf ab. Die Quantifizierungsstandards und Patientenproben müssen mit der identischen Methodik extrahiert werden, da es ansonsten zu fehlerhaften Testergebnissen kommen kann.

LITERATUR

1. Fryer JF. Heath AB, Anderson R, Minor PD and the collaborative study group. Collaborative study to evaluate the proposed 1st WHO International Standard for human cytomegalovirus (HCMV) for nucleic acid amplification (NAT)-based assays. WHO ECBS Report 2010; WHO/BS/10.2138.
2. NCCLS H18-A2. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens; Approved Guideline. 2. Auflage (1999).
3. CDC-NIH Manual. (1999) Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 4. Aufl. und National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of Laboratory Workers from Instruments, Biohazards and Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids and Tissue (NCCLS M29-A).

Dieser Beipackzettel ist auf www.focusdx.com in Französisch, Deutsch, Italienisch, Spanisch und brasilianischem Portugiesisch verfügbar. Versionen in anderen Sprachen sind möglicherweise bei Ihrem lokalen Vertriebspartner verfügbar.

VERTRIEB DURCH:
mdi Europa GmbH, Langenhagener Str. 71 30855, Langenhagen-Hannover, Deutschland

CE 0344

BESTELLINFORMATIONEN
Telefon: **800-838-4548 (nur USA)** **562-240-6500 (International)**
Fax: **562-240-6510**

PI.MOL2210.OUS.DE
Rev. B
Erstellungsdatum: 21. Oktober 2011

TECHNISCHE HILFE
Telefon: 800-838-4548 (nur USA) 562-240-6500 (International)
Fax: 562-240-6526
Besuchen Sie unsere Webseite: www.focusdx.com

FOCUS Diagnostics
Cypress, Kalifornien 90630 USA